



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 5/10, 1/21, C12P 21/02, C07K 14/50, A61K 37/36</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/20929</p> <p>(43) 国際公開日 1997年6月12日(12.06.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03579</p> <p>(22) 国際出願日 1996年12月6日(06.12.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/345689 1995年12月7日(07.12.95) JP 特願平8/103240 1996年3月28日(28.03.96) JP 特願平8/214378 1996年7月24日(24.07.96) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 伊藤信行(ITO, Nobuyuki)[JP/JP] 〒520 滋賀県大津市柳川1-24-7 Shiga, (JP) 根来尚温(NEGORO, Takaharu)[JP/JP] 〒550 大阪府大阪市西區北堀江12-10-506 Osaka, (JP) 勝又 隆(KATSUMATA, Takashi)[JP/JP] 〒669-13 兵庫県三田市あかしあ台1-37-2 Hyogo, (JP)</p>	<p>田頭秋三(TAGASHIRA, Shuzo)[JP/JP] 〒662 兵庫県西宮市丸橋町4-15 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

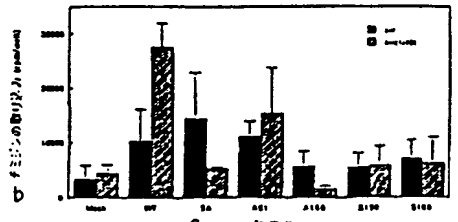
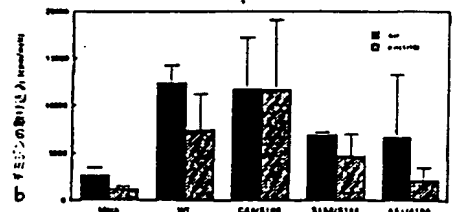
(54) Title: FIBROBLAST GROWTH FACTOR FGF-10

(54) 発明の名称 線維芽細胞増殖因子FGF-10

(57) Abstract

A recombinant FGF-10 obtained by introducing an expression vector into which a DNA encoding a specific amino acid sequence has been integrated into a host cell, incubating the transformant thus obtained, and allowing it to produce the aimed protein. This recombinant FGF-10 is applicable to drugs and reagents utilizing the cell growth-promoting effect thereof.

A FGF-10 細胞に対する FGF-10 受容体のアミノ酸配列



a ... Mitogenic activity of FGF-10 modification on FRSK cells
b ... Thymidine uptake (cpm/well)
c ... FGF-10 modification

(57) 要約

特定のアミノ酸配列をコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを、宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培養して蛋白を産生させ、組換FGF-10を得る。この組換FGF-10蛋白は細胞増殖作用を利用した医薬、実験試薬として応用し得る。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EF	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア共和国
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	HN	ホンジュラス	MG	マダガスカル	TD	チャド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MK	マケドニア	TG	トーゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード
CG	中央アフリカ共和国	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KR	大韓民国	NL	オランダ	US	米国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DK	デンマーク	LU	ルクセンブルグ	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア

明 細 書

線維芽細胞増殖因子 FGF-10

5 技術分野

本発明は、新規な線維芽細胞増殖因子（以下、FGFと略称する）およびその組換え製法に関する。更には、当該因子の医薬用途に関する。

背景技術

FGFは、1970年代に血管新生因子として発見された。当初、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）や塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）が研究され、その構造や広範な細胞増殖促進作用が明らかにされてきた〔D. Gospodarowics 他；Nature 249 巻123 頁（1974）、Burgess, W. H. および Maciag, T. ; Annu. Rev. Biochem. 58 巻575-606 頁（1989）、SUZUKI, F. ; 15 Clinical Calcium. 4 巻1516-1517 頁（1994）〕。現在では、計9種類のFGF類が報告されており、それぞれのクローニング、構造解析も成されている〔細胞、27 巻9 号341-344 頁（1995）〕が、それ以外のFGF類の存在については可能性のみ示唆されていた。

一方、bFGFやaFGFはその広範な細胞増殖促進作用を利用して、神経系、20 血管系や骨代謝系の疾患において、有望な治療剤となる可能性が検討されているが、現在もまだ、臨床治験に於ける有用性が証明されるには至っていない。新規なFGFでの同様の研究が待望されている。

本発明の目的は、新規なFGFの遺伝子を発見し解析することによって、その組換え蛋白の工業的生産方法を提供することである。

25 発明の開示

発明者は、未知のFGFのDNAについて鋭意検討を行った結果、全く新しいタイプのFGF（以下、FGF-10と略称する）のDNAを取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下の（1）-（15）に示すように、FGF-10をコードする

DNA、当該DNAを担持した発現ベクター、形質転換体、それらを用いた組換え蛋白の製造方法、および組換え蛋白、更には、FGF-10組換え蛋白の医薬用途に関するものである。

(1) 配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列のポリペプチドで
5 ある線維芽細胞増殖因子をコードする塩基配列、またはこれに相補的な塩基配列を包含する組み換えDNA。

(2) 配列番号：3もしくは配列番号：4に示す塩基配列またはこれに相補的な塩基配列を包含する(1)記載のDNA。

(3) (1)のDNAを担持する発現ベクター。

10 (4) (3)の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

(5) 宿主が動物細胞または大腸菌である(4)の形質転換体。

(6) (4)の形質転換体を使用することを特徴とする組換え線維芽細胞増殖因子の製造方法。

(7) 配列番号：1もしくは配列番号：2に示されるアミノ酸配列またはその主
15 要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。

(8) (5)の形質転換体が生産し、細胞増殖活性を示す事を特徴とする、配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。

(9) (7)もしくは(8)の組換え線維芽細胞増殖因子を有効成分として含有
20 する医薬。

(10) 骨／軟骨疾患または骨／軟骨損傷治療剤である(9)の医薬。

(11) 創傷治癒促進剤である(9)の医薬。

(12) 骨／軟骨疾患または骨／軟骨損傷治療剤の製造のための(7)もしくは(8)の組換え線維芽細胞増殖因子の使用。

25 (13) 創傷治癒促進剤の製造のための(7)もしくは(8)の組換え線維芽細胞増殖因子の使用。

(14) (7)もしくは(8)の組み換え線維芽細胞増殖因子の有効量をヒトを含む動物に投与することを含む骨／軟骨疾患または骨／軟骨損傷の治療方法。

(15) (7)もしくは(8)の組換え線維芽細胞増殖因子の有効量をヒトを含

む動物に投与ことを含む創傷治癒促進方法。

図面の簡単な説明

図1は、FGF-10遺伝子のクローニングに用いた2種類のFGF-3、FGF-7、FGF-10共通プライマー、(A) Tyr-Leu-Ala
5 -Met-Asn-Lys、(B) Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Serを示す。

図2は、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法に用いたFGF-10 cDNA単離用プライマーを示す。

図3は、プラスミドpFGF-10から、プラスミドpCDM8-F10SP
10 およびpCDM8-F10HXを得るまでのプラスミド構築方法の概略を示す。

図4は、翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換するために用いたプライマーおよびPCR反応条件を示す。

図5は、in situ ハイブリダイゼーション法によるラット関節組織におけるFGF-10 mRNAの発現を示す写真であり、(A)は、関節軟骨標本
15 の顕微鏡写真、(B)は、骨端軟骨板の顕微鏡写真である。

図6は、トリチウム標識チミジンのFRSK培養細胞への取込みを示すグラフである。横軸Bqはコントロール、Sp、HxはそれぞれFGF-10発現COS細胞の培養液を加えた場合を示す。縦軸は細胞内の放射活性を示す。

図7は、試験例におけるヒトFGF-10投与群の脛骨軟X線写真の画像処理
20 像である。

図8は、試験例における対照群の脛骨軟X線写真の画像処理像である。

図9は、FGF-10改変体発現プラスミドの構築概念図であり、変異DNA断片の作成を示す。

図10は、COS細胞発現ヒトFGF-10、およびその改変体の生理活性を示し、トリチウム標識チミジンのFRSK培養細胞への取り込みを示すグラフである。横軸の記号WTは天然型ヒトFGF-10、DN1~5、DC1~4、C84/S106、S150/S106、A51/A196、SA、A51、A196、S150及びS106 (Avrは培養上清原液、Avr (1/10)は培養上清の1/10希釈液)はそれぞれのFGF-10改変体を意味し、縦軸はF

R S K細胞中の放射活性を表す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、用語の意味または定義は下記の通りである。

- 「FGF-10」は、配列番号：1もしくは配列番号：2に示されるアミノ酸
- 5 配列またはその主要部分を包含する哺乳類の産生する線維芽細胞増殖因子を意味する。主要部分とは、前記配列から、シグナル（プレ）配列またはプロ配列が除かれたマチュア蛋白アミノ酸配列を意味する。すなわち、配列番号：1における37位グルタミン（Gln）から215位セリン（Ser）に到る179アミノ酸残基からなるアミノ酸配列、または配列番号：2における38位グルタミン
- 10 （Gln）から208位セリン（Ser）に到る171アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である。

- なお、現在公知の技術により、配列番号：1もしくは配列番号：2に示されるアミノ酸配列またはその主要部分の一部のアミノ酸残基を欠失、置換あるいは付加させた蛋白質を製造することが可能であり、ランダムスクリーニングあるいは
- 15 他のFGFファミリー蛋白に於ける配列改変研究の知見から、本件発明のFGF-10と生理活性の点で同質の改変蛋白質を創製することが可能である。これらの改変蛋白質も線維芽細胞増殖因子活性を示すかぎり、本件発明の技術範囲に属する物である。また、FGF-10は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列の50-52位に存在するAsn-Ser-Ser、203-205位のAsn-
- 20 Thr-Ser、配列番号：2に示されるアミノ酸配列の51-53位に存在するAsn-Ser-Ser、196-198位のAsn-Thr-Ser、二か所にN結合型糖鎖結合部位を有する蛋白質であるが、一般的には、糖鎖の有無に関わり無く生理活性を有する。公知の宿主の選択により糖鎖の種類を変更すること、あるいは除去することができるが、これらの糖鎖改変蛋白質も下記の線維芽
- 25 細胞増殖因子活性を示すかぎり、本件発明の技術範囲に属する物である。

なお、下記（1）から（5）のタイプのFGF-10改変体も、天然型FGF-10と同様の生理作用を示し、本件発明の技術範囲に属するものである。

（1）天然のFGF-10が有するCys残基が他のアミノ酸（Ser or Ala）に置換された、分子内および分子間ジスルフィド結合を生じないFGF

- 10 改変体、

(2) FGF-10 の成熟蛋白質領域内の 2 ヶ所の Cys 残基の内の 1 つ (Cys-106) は他の FGF 類で保存されている Cys の位置と異なるため、他の FGF 類で保存されている位置のアミノ酸 (Ser-84 in FGF-10) が Cys に置換され、保存されていない位置の Cys-106 が他のアミノ酸 (Ser または Ala) に置換された、FGF 類で保存された位置に Cys 残基を有する FGF-10 改変体、

(3) 糖鎖付加配列 (Asn-X-Y: X は Cys, Pro 以外の任意のアミノ酸、Y は Ser または Thr) を、他のアミノ酸配列に置換することにより、糖鎖付加を生じない FGF-10 改変体、

(4) N 末および／あるいは C 末の数～100 アミノ酸が欠乏した FGF-10 改変体、

(5) プロテアーゼにより切断を受ける可能性のあるアミノ酸配列が他のアミノ酸配列に置換された FGF-10 改変体。

15 より具体的に下記 (1) から (19) の FGF-10 改変体を例示する。これらは、実施例にて詳述するように、今日の遺伝子工学公知の手法により、作成することができる。

(1) リーダー領域内の 7 ヶ所の Cys 残基内の 6 ヶ所 (Cys-9, -19, -20, -21, -22, 及び -23) が全て Ala あるいは Ser に置換された FGF-10 改変体、

(2) Cys-106 が Ala あるいは Ser に置換された FGF-10 改変体、

(3) Cys-150 が Ala あるいは Ser に置換された FGF-10 改変体、

(4) Cys-106 および Cys-150 が共に Ala あるいは Ser に置換された FGF-10 改変体、

25 (5) Ser-84 が Cys に置換され、さらに Cys-106 が Ala あるいは Ser に置換された FGF-10 改変体、

(6) Cys-9, -19, -20, -21, -22, -23, -37, -106 および -150 が全て Ala あるいは Ser に置換された FGF-10 改変体、

(7) Asn-51 が Ala に置換された FGF-10 改変体、

- (8) Asn-196がAlaに置換されたFGF-10改変体、
- (9) Asn-51およびAsn-196が共にAlaに置換されたFGF-10改変体、
- (10) 成熟蛋白質のN末端のアミノ酸(Leu-40)からThr-50までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- (11) 成熟蛋白質のN末端のアミノ酸(Leu-40)からSer-62までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- (12) 成熟蛋白質のN末端のアミノ酸(Leu-40)からLys-81までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- 10 (13) 成熟蛋白質のN末端のアミノ酸(Leu-40)からLys-103までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- (14) 成熟蛋白質のN末端のアミノ酸(Leu-40)からLys-137までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- (15) Asn-196からSer-208までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- 15 (16) Gly-189からSer-208までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- (17) Glu-154からSer-208までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- 20 (18) Gly-138からSer-208までのアミノ酸配列が欠失したFGF-10改変体、
- (19) (10)～(14)のいずれかのアミノ酸配列の欠失と(15)～(18)のいずれかのアミノ酸配列の欠失が組み合わされたFGF-10改変体。

- 「線維芽細胞増殖因子活性」とは、細胞増殖刺激作用、造血幹細胞増殖作用、
- 25 血管新生作用など種々の細胞に対する細胞増殖促進作用、細胞分化誘導作用や細胞外マトリックス改変作用などの分化調節作用、神経細胞の生存維持作用等、多岐に渡るFGF類の生理活性のうちの少なくとも一種〔臨床検査 38巻、11号、219-221頁(1994年 増刊号)〕を意味する。FGF-7において見られるような、ラット胎児由来表皮細胞(FRSK細胞)を始めとする上皮

細胞由来細胞株の細胞増殖刺激作用も、当該活性に含まれるものとする。

「骨／軟骨損傷治療剤または骨／軟骨疾患治療剤」とは、事故による骨折や手術に伴う骨／軟骨の切除など、骨／軟骨の物理的な損傷の治癒を促進するための医薬製剤または、骨／軟骨形成の低下を主たる症状とする疾患を治療するための

5 医薬製剤であり、下記（１）から（６）の医薬用途を指向するものである。

（１）骨欠損治療剤、（２）骨折治療剤、（３）骨粗鬆症治療剤、（４）軟骨組織修復促進剤、（５）関節軟骨組織修復治療剤、および、（６）変形関節症治療剤。

「創傷治癒促進剤」とは、事故による物理的／化学的要因による外傷や凍傷、

10 熱傷の治癒促進のための医薬製剤を意味する。放射線障害、床擦れや糖尿病によって生じる皮膚潰瘍など、難治性の皮膚筋肉組織障害の治癒促進剤も含む。

以下、本発明をより詳細に説明する。

FGF-10 遺伝子の取得

本発明の FGF-10 をコードする DNA は、公知の遺伝子工学的方法にて製造出来る。すなわち、哺乳類の生体組織あるいは培養細胞から、mRNA を単離し、それから二本鎖 cDNA を得ることができる。さらに、この cDNA をプライマーに用いて、PCR 法を行い、増幅し、適宜配列を決定できる。これらはいずれも専用キットが市販されている。なお、mRNA の原料の生体組織や培養細胞は特に種類を限定されるものではないが、特に、約 14 日令のラット胎児を用いる方法が好適である。肺や関節組織における mRNA 発現が比較的多いため、肺細胞、骨／軟骨由来細胞由来の培養細胞等も用いる。市販の成人ヒト肺由来ポリ（A）+RNA〔クローンテック社〕などを使用する方法も簡便で好ましい。

また、本特許明細書に開示の FGF-10 をコードする DNA 配列の中から、適当な配列を DNA プローブとして用い、種々の生体由来の cDNA またはゲノム遺伝子ライブラリーからクローニングすることができる。

遺伝子ライブラリーは常法に従って、下記のように調製する。

1. 動物組織を凍結粉末化したものを RNase 及びプロテアーゼ処理し、高分子量 DNA を沈澱させて得る。DNA 抽出物については、市販のものが利用できる〔クローンテック（clontech）社等〕；

2. 制限酵素 (E c o R I 等) で部分的に切断し、エタノール沈澱でDNA断片を得る；
3. DNAリガーゼを用いて、λファージにDNA断片を挿入し；
4. 市販の *in vitro* パッケージングキットを用いて、パッケージングを
- 5 行い、遺伝子ライブラリーを作る。

DNAプローブは、本特許明細書に開示のFGFファミリー蛋白をコードするDNA配列の中から、特異性の高い配列を選ぶ。常法により、化学合成し、³²P等でラベルすることができる。

FGF-10蛋白質の製造

- 10 こうして得られたFGF-10のcDNAを組み込む発現ベクターとしては、適当な大腸菌、枯草菌、酵母、動物昆虫細胞等の宿主内で増殖できるプラスミドやファージが選ばれるが、例えば、大腸菌由来のpBR322、pBR325 [Gene 4巻121頁(1978)]、枯草菌由来pUB110 [Biochem. Biophys. Res. Commun.) 112巻, 67
- 15 8頁(1983)]、COS細胞に好適なpCDM8等が挙げられる。cDNAをプラスミドに組み込む方法としては、常法が、T. Maniatis 他、Molecular cloning、Cold spring harbor lab, 239頁(1982)に記載されている。

- 宿主は、ベクターの導入により形質転換され、FGF-10を産生できる生物
- 20 や培養細胞であれば、特に限定されない。細菌としては、大腸菌、枯草菌(バチルス類)等、酵母としては、サッカロマイセス属、トルラ属、ピキア属等、動物細胞としては、COS細胞、CHO細胞、NSO細胞等が代表例である。培養昆虫細胞、真菌、植物細胞、単細胞系だけでなく、目的蛋白質遺伝子を組み込まれた昆虫や哺乳類、植物も宿主の範疇に入る。

- 25 原核細胞産生系としては、大腸菌またはバチルス属細菌が一般的に用いられ、特に、プロテアーゼ産生能を低下させたBacillus brevisは、分泌発現のための宿主として有用である(参照：特開平6-296485、特開平6-133782、Y. Sagiya et al. : Applied Microbiol. Biotechnol. 42巻, 358-363頁(19

94) など)。

形質転換体から、公知の方法、例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法〔ジーン Gene, 10巻 63頁(1980)〕およびDNA塩基配列決定法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74巻560頁(1975 7)〕を用い、所望のクローンを選出する。また、COS細胞にて一過性に発現させ、培養上清の生理活性を評価してクローン選択することも可能である。

発現されたFGF-10蛋白の生理活性は、常法により容易に検出できる。たとえば、公知のFRSK細胞など、上皮細胞の増殖促進作用を測定することにより評価できる。

- 10 クローン化されたDNA含有プラスミドは、そのままあるいは制限酵素で切り出して利用することが可能であり、種々の宿主に適応した発現ベクターに組み込んで発現させ、FGF-10蛋白を大量に製造することができる。発現方法は特に制限されず、細菌を用いた融合発現、分泌発現および直接発現、また真核細胞を用いた発現など適宜、当該分野で公知の組換え蛋白生産技術が応用しうる。
- 15 組換え技術により生産されたFGF-10蛋白は、生化学の分野で常用される精製方法にて精製が可能である。イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相HPLC、硫安沈澱、限外濾過、SDS-PAGEなどが適宜組み合わせて用いられるが、FGF類の場合、特にヘパリン等のリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィー、抗体カラムクロマトグラフィーなどが大量精製に好適である。
- 20 FGF-10蛋白に対する抗体は、ポリクローナル、モノクローナル共に、自体公知の方法で作製し得る。FGF-10特異的抗体は抗体カラムに使用出来るだけでなく、ELISA等の免疫化学的定量法に使用できる。

上述の方法で得られたFGF-10蛋白は、細胞増殖促進作用を始めとする種々の生理作用を有しており、創傷治癒促進剤、循環不全治療剤、神経生存維持剤、
25 発毛促進剤などの医薬用途に用いうる。特に、成体哺乳類の軟骨組織での発現が認められており、骨折治癒等の骨疾患治療剤、軟骨・結合組織の損傷治療剤への応用が考えられる。また、細胞増殖促進用の実験試薬としても使用しうる。

FGF-10蛋白の動物およびヒトへの投与は通常の投与経路、例えば筋肉内、静脈内、皮下、腹腔内、経皮投与等により行うことができる。投与量および投与

回数は投与対象、投与経路、症状の程度、体重等によって異なり特に限定されないが、ヒトにおいては、通常成人1日あたり約 $1\mu\text{g}\sim 0.1\text{g}$ を1日1回もしくはそれ以上の回数で投与される。投与剤形としては、例えば注射剤などが挙げられる。製剤化の際は、通常の製剤担体を用い、常法により製造する。即ち、注射剤を調製する場合は、FGF-10蛋白の凍結乾品を生理食塩水に溶解し、必要によりpH調製剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法により注射剤とする。

以下の実施例によって、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

10 実施例1

FGF-10遺伝子の構造解析

ラット遺伝子ライブラリーの調製

14日齢ウイスターラット胎児全組織から、常法〔Chomoczynski 他、Anal. Biochem. 162巻, 156-159頁(1987)〕に従い、mRNAを調製した。そのラット胎児mRNAを鋳型に、ランダムプライマー(6mer)をプライマーとして、モロニーマウス白血病ウィルス逆転写酵素を用いてラット胎児cDNAを調製した。すなわち、ラット胎児ポリ(A)+RNA($5\mu\text{g}$)を300ユニットのMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO-BRL)、15ユニットのhuman placenta RNase inhibitor (和光純薬工業)および $0.5\mu\text{g}$ のランダムプライマー(6mer)を含む反応溶液中で 37°C 60分インキュベートして、cDNAを得た。

FGF-3及びFGF-7に共通なプライマーの作成

25 既知の7種類のヒトFGFのアミノ酸配列を比較し、FGF-3、FGF-7間でアミノ酸配列が同一である2箇所(Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys、Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Ser)を選び、図1に示す2種類のFGFプライマーを作成した。

ラットFGFファミリーDNAの増幅

ラット胎児cDNAを鋳型にし、上記の2種類のFGFプライマーとTaq DNA polymeraseを用いたpolymerase chain reaction (PCR) 法によりFGFファミリーDNAを増幅した。即ち、適当量のcDNA、0.05ユニット/ μ lのTaq DNAポリメラーゼ（和光
5 純薬工業）および5 pmol/ μ lの前述のセンスーまたはアンチセンスプライマーを含む反応溶液（25 μ l）を30サイクルのPCRに供した。反応後、溶液を8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望のサイズ（ \sim 110塩基対）のフラクションを電気泳動で溶出した。

ラットFGFファミリーDNAのスクリーニング

- 10 FGFプライマーにより増幅したFGFファミリーDNAをpGEM-T DNA vector (Promega) に挿入し、得られた組換えベクターを大腸菌 (XL1-blue株) に感染させ、DNAクローンを得た。cDNA配列の解析には、DNAシーケンサー373A (Applied Biosystems Inc.) を用いた。
- 15 各DNAクローンの塩基配列を決定したところ、既知のFGF-3、FGF-7のcDNA以外にも、既知のFGFファミリーペプチドと類似のアミノ酸配列構造を持つ（ \sim 50%）ペプチドをコードしている新規なFGFcDNAが単離された。これを、FGF-10と命名した。

ラットFGF-10 cDNAの全翻訳領域の構造解析

- 20 上記実験にて判明したFGF-10 cDNAの部分構造から、プライマーを作成し、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法 [Frohman, PCR Protocols-A guide to methods and applications, Academic Press, pp. 28-38 (1990)] を利用して全
25 翻訳領域を取得した。詳細は以下〔1〕～〔6〕に記述する。

〔1〕 FGF-10 cDNAの部分構造からプライマーA～D（図2、配列番号：5、6、7および8）を作成し、また、RACE法用として、プライマーX及びY（図2、配列番号：9および10）を作成した。

〔2〕 ランダムヘキサオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてラット胎児

mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した後、デオキシアデニン三リン酸の存在下に3' デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを作用させて3' 末端にポリ(A)配列を付加した。このようにして得られたcDNAを鋳型としてプライマーBおよびXを用いてPCRを行った。さらに、プライマーAおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue)を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをpFGF-10(5')と命名した。

[3] プライマーXを用いてラット胎児mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した。このようにして得られたcDNAを鋳型として、プライマーCおよびYを用いてPCRを行った。さらに、プライマーDおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue株)を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをpFGF-10(3')と命名した。

[4] pFGF-10(5')より得られた最も上流部分の塩基配列と、pFGF-10(3')より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列より、各々プライマーEおよびF(図2、配列番号:11および12)を作成した。

[5] ラット胎児mRNAを鋳型として、オリゴdTをプライマーとして逆転写酵素により、cDNA第一鎖を得た。これを鋳型としてプライマーEおよびFを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌(XL1-blue株)を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、pFGF-10(5')より得られた最も上流部分の塩基配列と、pFGF-10(3')より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列を連続して保持するクローンが得られた。この中の1クローンを選び、pFGF-10と命名した。このプラスミドに担持される全翻訳領域を含むFGF-10cDNAを解析した。

[6] 以上の結果を総合して配列番号:3の塩基配列(804bp)を決定した。

ラットFGF-10の全アミノ酸配列の決定

〔1〕 上記実験で得られたFGF-10 cDNAの塩基配列より、FGF-10 cDNAの翻訳領域は645bpからなり、FGF-10は配列番号：1で示される215アミノ酸からなる新規FGFであることが明らかになった。

〔2〕 アミノ酸配列の検討から、N末端にシグナル配列を有する分泌型の蛋白であることが分かった。マチュア部分は、37-215位で、179アミノ酸からなるポリペプチドと目される。50-52位に存在するAsn-Ser-Ser、203-205位のAsn-Thr-Serは、N結合型糖鎖結合配列であり、FGF-10は糖鎖を有している可能性がある。

実施例2

10 ラットFGF-10の哺乳動物細胞での発現

プラスミドの構築

プラスミドpFGF-10 (図3) をSph IとPst Iで消化し、ポリアクリルアミド電気泳動によりcDNA全長を含む断片を単離した。この断片をpUC19のSph I、Pst I消化物とライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換することにより、FGF-10 cDNAを含むプラスミドpUC-F10を得た。pUC-F10をHind III 及びXba Iで消化することによりFGF-10 cDNAを含む断片を切出し、哺乳動物細胞発現ベクターであるpCDM8のHind III、Xba I消化物とライゲーションし、大腸菌MC1061/P3株を形質転換することにより、CMVプロモーターの支配下にFGF-10 cDNAを有するプラスミドpCDM8-F10SPを得た。

一方、FGF-10 cDNAにおける推定翻訳開始コドン上流の塩基配列がコザックのコンセンサス配列からはずれていることから、本mRNAの翻訳効率が良くない可能性があることが考えられた。そこで、翻訳効率の向上を目的として、推定翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換する変異を導入することとした〔マリリン コザック (M. Kozak)、ザ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (The Journal of Cell Biology) 108巻 229-241頁 (1989. 2)〕。

変異の導入はPCRを利用し、pFGF-10を鋳型として図4に示す、5'末端にHind III 切断部位およびコザックのコンセンサス配列を有するセンス

プライマーと、5'末端にXbaI切断部位を有するアンチセンスプライマーを用いることにより行った（反応条件は図4参照）。

反応終了後、PCR産物をフェノールクロロホルム処理、エーテル処理、ついでエタノール沈澱を行い、HindIII およびXbaIで消化した後、ポリアク
5 リルアミド電気泳動により約700塩基対の断片を単離した。この断片を哺乳動物細胞発現ベクターであるpCDM8のHindIII、XbaI消化物とライゲーションし、大腸菌MC1061/P3株を形質転換して得られたコロニーの中から4クローンを選び、DNAシーケンサー（パーキンエルマー373型）を用いて塩基配列の解析を行った。

- 10 その結果、いずれのクローンも推定翻訳開始コドン上流の塩基配列はコザックのコンセンサス配列に置換されており、かつコードするアミノ酸配列に影響する変異は起きていなかったもので、これらの中から1クローンを選び、本プラスミドをpCDM8-F10HXと命名した。

実施例3

- 15 ラットFGF-10発現可能なプラスミドによるCOS-1細胞の形質転換

実施例2で構築したラットFGF-10発現可能なプラスミド、pCDM8-F10SP及びpCDM8-F10HXを通常の方法に従って大量に調製し、塩化セシウム密度勾配超遠心を2回行って精製した。これら2種類のプラスミド及びコントロールとしてpCDM8を用いて、電気パルス法によりCOS-1細胞
20 の形質転換を行った。形質転換された細胞は、リジンセファロースクロマト処理した牛胎児血清10%を含有するDMEMで24時間培養された後、培地を無血清のDMEMに交換、さらに継続して96時間培養された。このようにして得た培養液を遠心後、その上清を分注し-80℃で凍結保存した。

実施例4

- 25 in situ ハイブリダイゼーション法による軟骨におけるFGF-10 mRNAの発現の確認

プローブの調製

FGF-10 cDNAをpGEM-Tベクターに組み込み、そのプラスミドを大腸菌JM-109にトランスフェクトした後、大量培養を行い、ファルマシア

社のFlexi Prep kitを用いて純度の高いFGF-10 cDNAを精製した。パーキンエルマー373A/DNAシーケンサーを用いて配列を確認したのち、ベーリンガー社のDIG/RNAラベリング キット (SP6/T7) を用いてcRNAプローブを作成した。

5 切片作成

ウイスター系雌性ラットを3週令で屠殺後、大腿骨と脛骨を関節を保持した状態で摘出し、軟部組織を除去し、適当な大きさにトリミング後、素早く固定液 (4%パラホルムアルデヒド) に浸し、4℃で一晩固定した。脱水後、脱灰液 (10% EDTA、15% グリセロール-PBS) に浸し、4~5日間脱灰を行った (毎日、液は交換した)。その後、膝関節前後約2 cmにトリミングし、O.C. Tコンパウンドに浸し、液体窒素にて凍結させ、クリオスタットを用いて厚さ10 μmの関節組織切片を作製し、シランコーティングスライドガラスにマウントした。

ハイブリダイゼーション

- 15 前述の関節組織切片の前処理 (プロテイナーゼK消化、0.2 M HClで内在性のアルカリフォスファターゼを不活化、0.1 M TEA: 0.25% 無水酢酸でアセチル化) を行った後、エタノール系列で脱水し風乾した。そして前述のプローブをハイブリダイゼーション液 (50% ホルムアミド、10 mM Tris-HCl / pH 7.6、200 μg/ml tRNA、1 ×
- 20 Denhardt's solution、10% Dextran sulfate、600 mM NaCl、0.25% SDS) で10倍に希釈し、一切片当り50 μl 載せ、小さく切ったパラフィルムで覆い、50℃で16時間インキュベーションした。RNase Aで不要なプローブを消化しSSCで洗浄した後、抗体反応、発色反応を行った。

25 抗体反応および発色反応

プローブの洗浄が終わった切片をブロッキング液に60分浸した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Anti-Digoxigenin-AP: Fab fragment: ベーリンガー マンハイム) を乗せ、37℃で1時間インキュベーションした。抗体液を洗った後、

NBT、X-フォスフェイトを加え、37℃でインキュベーションし発色反応を行った(12時間)。発色を確認した後、発色停止液(10mM Tris-HCl/pH7.6、1mM EDTA/pH8.0)に漬け、蒸留水で洗った後、水性封入した。

5 結果

図5(A)(B)に示すように軟骨細胞に発色が確認された。FGF-10のmRNAが軟骨細胞に発現していることから、FGF-10は軟骨に対する活性を有する骨および軟骨の損傷修復等に関与する因子であると推定される。

実施例5

10 FRSK細胞を用いた細胞増殖活性の検討

細胞培養

ラットの上皮細胞であるFRSK細胞は、培養面積75平方cmの培養フラスコ当たり15mlの10%ウシ胎児血清を含むF-12培地を用いて、37℃、5%二酸化炭素/95%空気の気相下で培養した。細胞は7日に一度、1/10の

15 割合で継代を行った。

FGF-10蛋白の発現

FGF-10をCOS-1細胞で一過性に発現させ(実施例3参照)、その培養上清を以下のアッセイに供した(以下、pCDM8-F10SPを用いて得られた培養上清をFGF-10/Sp、pCDM8-F10HXを用いて得られた
20 培養上清をFGF-10/Hx、コントロールプラスミドpCDM8を用いて得られた培養上清をBqと表示する)。

・DNA合成アッセイ(トリチウム標識チミジンの取込み):細胞をサブコンフルエントまで培養した後、トリプシン処理により細胞を剥がし、上記培地を用いて10000細胞/mlに調整し、96穴プレートに100μlずつ播き込み、
25 37℃、5%二酸化炭素/95%空気の気相下で培養を行った。2日に一度、培地を新しい上記培地100μlに交換し、7日間培養を行った後、培地を0.1%ウシ血清アルブミンを含むF-12培地100μlに交換した。24時間後、COS上清を25μl添加し、18時間37℃、5%二酸化炭素/95%空気の気相下で培養を行い、0.2μCiのトリチウム標識チミジンを含むF-12培

地 $20 \mu\text{l}$ を添加、引続き同条件下で培養した。4 時間後培地を除去し、 2N NaOH を $50 \mu\text{l}$ 添加して 30 分静置、細胞を死滅させた。 1N HCl で中和後、細胞をセルハーベスターで回収し、ベータプレートにてカウントを計測した。

5 結果

図 6 に示すように、コントロール群：Bq (100%) と比較して、FGF-10 発現群：Sp、Hx は FRSK 細胞のトリチウム標識チミジンの取込みを大きく増加させた (各々 286% 、 501%)。FGF-10 は上皮細胞の増殖を促進する因子であることが示唆される。

10 実施例 6

ヒト FGF-10 遺伝子の構造解析

ヒト遺伝子ライブラリーの調製

市販のヒト肺ポリ (A) + RNA [クローンテック (clontech) 社：カタログ番号 6524、成人男性全肺由来] を鋳型に、ランダム プライマー (6mer) をプライマーとして、モロニーマウス白血病ウィルス逆転写酵素を用いてヒト肺 cDNA を調製した。すなわち、ヒト肺ポリ (A) + RNA ($5 \mu\text{g}$) を 300 ユニットの Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO-BRL)、15 ユニットの human placenta RNase inhibitor (和光純薬工業) および $0.5 \mu\text{g}$ のランダム プライマー (6mer) を含む反応溶液中で 37°C 60 分インキュベートして、cDNA を得た。

ヒト FGF-10 遺伝子増幅用プライマーの作成およびヒト FGF ファミリー DNA の増幅

25 実施例 1 で使用した、図 1 に示す 2 種類の FGF プライマー (Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys、Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Ser) を選び、ヒト FGF-10 遺伝子増幅に用いた。

ヒト肺 cDNA を鋳型にし、上記の 2 種類の FGF プライマーと Taq DNA polymerase を用いた polymerase chain

chain (PCR) 法によりFGFファミリーDNAを増幅した。即ち、適当量のcDNA、0.05ユニット/ μ lのTaq DNAポリメラーゼ（和光純薬工業）および5 pmol/ μ lの前述のセンスーまたはアンチセンスプライマーを含む反応溶液（25 μ l）を30サイクルのPCRに供した。反応後、溶液を
5 8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望のサイズ（ \sim 110塩基対）のフラクションを電気泳動で溶出した。

ヒトFGFファミリーDNAのスクリーニング

FGFプライマーにより増幅したFGFファミリーDNAをpGEM-T DNA vector (Promega) に挿入し、得られた組換えベクターを
10 大腸菌 (XL1-blue株) に感染させ、DNAクローンを得た。cDNA配列の解析には、DNAシーケンサー373A (Applied Biosystems Inc.) を用いた。

各DNAクローンの塩基配列を決定したところ、ラット型FGF-10と同一の配列を有するペプチドをコードするcDNAが増幅されていた。この遺伝子は
15 ヒトFGF-10をコードするものと考えられた。

ヒトFGF-10 cDNAの全翻訳領域の構造解析

実施例1と同じ方法でヒトFGF-10全翻訳領域を含むcDNAを増幅及び解析し、配列番号：4の塩基配列を決定した。詳細は以下〔1〕～〔6〕に示す。

〔1〕ヒトFGF-10 cDNAの部分構造からプライマーA' およびD' (図
20 2、配列番号：13および14) を作成した。プライマーB、C、XおよびY (図2、配列番号：5、6、7および8) は実施例1で使用したものを流用した。用いた。

〔2〕ランダムヘキサオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてヒト肺mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した後、デオキシアデニン三リン酸の存在下に3' デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを作用させて3' 末端にポリ(A)配列を付加した。このようにして得られたcDNAを
25 鋳型としてプライマーA' およびXを用いてPCRを行い、さらに、プライマーBおよびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をpGEM-Tに挿入し、大腸菌 (XL1-blue) を形質転換することにより、上記の部分配列の一部

を含むクローンが得られたので、これをp h F G F - 1 0 (5') と命名した。

〔3〕プライマーXを用いてヒト肺mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成した。このようにして得られたcDNAを鋳型として、プライマーCおよびXを用いてPCRを行った。さらに、プライマーD' およびYを用いてPCRを行った。得られた増幅断片をp G E M - Tに挿入し、大腸菌(X L 1 - b l u e株)を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、上記の部分配列の一部を含むクローンが得られたので、これをp h F G F - 1 0 (3') と命名した。

〔4〕p h F G F - 1 0 (5') より得られた翻訳領域上流部分の塩基配列は、ラット型遺伝子と同じ配列を含んでいたので、5' 側のプライマーとしてプライマーE(図2: 配列番号12)を流用した。また、p h F G F - 1 0 (3') より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列から、3' 側のプライマーとして新たにプライマーF' (図2: 配列番号15)を作成した。

〔5〕ヒト肺mRNAを鋳型として、オリゴdTをプライマーとして逆転写酵素により、cDNA第一鎖を得た。これを鋳型としてプライマーEおよびF'を用いてPCRを行った。得られた増幅断片をp G E M - Tに挿入し、大腸菌(X L 1 - b l u e株)を形質転換することによりクローン化した。数クローンの塩基配列を決定したところ、p h F G F - 1 0 (5') より得られた翻訳領域上流部分の塩基配列と、p h F G F - 1 0 (3') より得られた最も下流部分の塩基配列の塩基配列を連続して保持するクローンが得られた。この中の1クローンを選び、p h F G F - 1 0 と命名した。このプラスミドに担持される全翻訳領域を含むヒトF G F - 1 0 cDNAを解析した。

〔6〕以上の結果を総合し、配列番号: 4の塩基配列(690bp)を決定した。

ヒトF G F - 1 0の全アミノ酸配列の決定

25 上記実験で得られたcDNAの塩基配列より、ヒトF G F - 1 0 cDNAの翻訳領域は624bpからなり、ヒトF G F - 1 0は配列番号: 2で示される208アミノ酸からなるポリペプチドであることが明らかになった。また、アミノ酸配列の検討から、N末端にシグナル配列を有する分泌型の蛋白であることが分かった。マチュア部分は、38-208位で、171アミノ酸からなるポリペプチ

ドと目される。51-53位に存在するAsn-Ser-Ser、196-198位のAsn-Thr-Serは、N結合型糖鎖結合配列であり、この部位に糖鎖を有している可能性がある。

実施例7

5 ヒトFGF-10成熟蛋白の発現と精製

pFGF-10を鋳型として以下のプライマーペア（配列番号：16、配列番号：17）を用いて15サイクルのPCRを行い、フェノール/クロロホルム処理後エタノール沈殿を行い、さらにNdeIおよびBamHIで消化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて目的の大きさのバンドを分取することにより、ヒトFGF-10 cDNAの成熟アミノ酸配列に相当するDNA断片（a）を得た。一方、大腸菌発現ベクターであるpET11c（ストラタジーン）をNdeIおよびBamHIで消化し、アガロースゲル電気泳動にて分取することにより直鎖化したベクターDNA（b）を得た。これら（a）と（b）をライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換することによりクローン化した。これらの中から

- 15 （a）が正しい方向に挿入されたプラスミドを単離し、塩基配列の確認を行い、pET-hFGF-10を得た。これを用いて大腸菌BL21（DE3）を形質転換した。得られた組換えクローンのうちの1つをBL21（DE3）/pET-hFGF-10と名づけ、これを用いてヒトFGF-10の発現生産を行った。

BL21（DE3）/pET-hFGF-10をアンピシリン100 μ g /mlを含むLB培地10mlに植菌したものを4本用意し、37℃で一晩前培養を行った。翌日それぞれ全量を100 μ g/mlを含むTB培地500ml \times 4本に植え込み37℃で振とう培養した。OD600=0.8に達した時点でIPTGを最終濃度が1mMになるように添加し、培養温度を28℃に下げても6時間培養を継続した。

- 25 培養液を遠心分離し、得られた菌体を50mM Tris-HCl, pH8.0にて1回洗浄し、1mM EDTA、2 μ g/ml ロイペプチン、2 μ g/ml ペプスタチン、1mM PMSFを含む50mM Tris-HCl, pH8.0にて懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、ベックマンJ2-21M/E高速冷却遠心機にてJA-20ローターを用いて、15000回転で1時間遠心分離

することにより上清を採取した。HiTrap Heparin (5ml, ファルマシア) を50mM Tris-HCl, pH 8.0で平衡化し、先に調製した菌体破碎上清をアプライした。続いて50mM Tris-HCl, pH 8.0で溶出液のA260がベースラインに戻るまで洗浄した後、連続的にNaCl濃度5
5 勾配を3Mまで増加させることにより、蛋白を溶出した。組換えヒトFGF-10に相当する約19kDaの蛋白は約1.2M NaClの位置に溶出された。なお、流速は2ml/分で行った。

続いて、上記溶出画分を50mM Tris-HCl, pH 8.0で2倍希釈し、HiTrap SP (5ml, ファルマシア) にアプライした。50
10 mM Tris-HCl, pH 8.0で洗浄した後、連続的にNaCl濃度勾配を2Mまで増加させることにより、蛋白を溶出した。組換えヒトFGF-10に相当する約19kDaの蛋白は約1.2M NaClの位置に溶出された。なお、流速は2ml/分で行った。次に、上記溶出画分を透析によりPBS (-) に置換し、さらにエンドトキシンを除去するために1/10量のピロセップ1C
15 (ダイセル工業) を添加し、2時間4℃で振とうした後、上清を回収した。エンドトキシン濃度をエンドスペースES-6 (生化学工業) を用いて定量した結果、検出限界以下であった。得られた蛋白をプロテインアッセイキット (バイオラッド) を用いて定量した結果、総計3.5mgの蛋白が得られたことが明らかとなった。

20 実施例8

骨組織に及ぼすFGF-10の影響

以下、製剤例および試験例により本発明の骨(軟骨)疾患治療剤の製剤および骨(軟骨)組織形成・修復作用効果について説明する。

・製剤：実施例7の方法で作成した精製ヒトFGF-10成熟蛋白を用いて、注
25 射用水溶液を調製した。即ち、ヒトFGF-10 (2.12mg) を生理食塩液 (1ml) に溶解させ、下記の実験に供した。

in vivo薬効評価試験：骨組織に及ぼすFGF-10の影響

4週齢のWistar系雄性ラット (体重94~120g) を1群3ないし4
個体として計3群用意した。エーテル麻酔下で27ゲージ針のマイクロシリンジ

を用いて脛骨骨髓腔内に前記製剤例 1 で調製した F G F - 1 0 水溶液剤を用いて、それぞれ 1 0 . 6、2 1 . 2 μ g 骨髓腔に相当する液量を投与した。一群には対照群として生理食塩液を投与した。

4 日間飼育した後、屠殺し、脛骨を摘出した。脛骨の軟 X 線写真を撮影し写真
5 像をスキャナーを用いてパーソナルコンピュータに取り込み、画像処理プログラムを使用して、骨形成の像を観察した。

F G F - 1 0 投与群の観察結果を図 7 に対照群の観察結果を図 8 に示した。ヒト F G F - 1 0 投与群においては、骨形成の亢進を示す石灰化部分の増加が認められる。ヒト F G F - 1 0 注入 4 日目の骨髓腔内の骨形成について、軟 X 線写真
10 の画像解析像から評価した結果を表 1 に示す。

表 1

15	F G F - 1 0 (μ g)	0	1 0 . 6	2 1 . 2
	匹数	3	4	4
	対照群と比較して骨形成亢進が認められた匹数	—	4	4

これらの結果、ヒト F G F - 1 0 は骨／軟骨疾患治療で重要な骨／軟骨組織の
20 明らかな形成・修復促進作用を示した。

実施例 9

F G F - 1 0 改変体の作成：F G F - 1 0 改変体哺乳類細胞で発現可能なプラスミドの構築

ヒト F G F - 1 0 を哺乳類細胞で発現可能なプラスミドの構築

25 実施例に記載の p C D M 8 - F 1 0 H X の構築と同様に行なった。即ち、天然のヒト F G F - 1 0 配列を有するプラスミド p h F G F - 1 0 を鋳型として図 4 に示すサブライマー F 1 0 H S の代わりに下記プライマー h F 1 0 H X を、またプライマー F 1 0 X R の代わりに下記プライマー h F 1 0 X R を用いた P C R 反応を行い、反応物を H i n d III および X b a I で消化後、ポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動により約700bpの断片を単離した。この断片をpCDM8のHindⅢ、XbaⅠ消化物とライゲーションし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のヒトFGF-10を哺乳類細胞で発現可能なプラスミドpCDM8-hF10HXを得た。

5 プライマー 5' → 3'

hF10HS TTTAAGCTTCCACCATGTGGAAATGGATACTGAC

hF10XR TTTTCTAGAACAAACGGTGCCTTCCTCTATG

pCDM8-F10 (S106) の構築 (図9A)

まず、変異配列を有するプライマー1およびプライマー1に部分的に相補的な
10 配列を有するプライマー2ならびにこれら2種のプライマーではさまれる領域の外側の領域にアニールする2種のプライマー3および4を作成した。天然のヒトFGF-10遺伝子配列を有するプラスミドpCDM8-hF10HXを鋳型とし、プライマー1とプライマー3を用いたPCR反応により、置換配列を有するDNA断片1を取得した。これとは別に、同鋳型に対しプライマー2とプライマー4を用いたPCR反応により、同部位の置換配列を有し、DNA断片1と部分的に重複した配列を有するDNA断片2を取得した。次に、このようにして取得されたDNA断片1とDNA断片2を鋳型とし、プライマー3とプライマー4を用いたPCR反応を行うことにより、DNA断片3を取得した。その後、DNA断片3を2種の制限酵素HindⅢおよびXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10 (S106) を取得した。

pCDM8-F10 (S150) の構築

プライマー1の代わりにプライマー5を、プライマー2の代わりにプライマー
25 6を用いた以外はpCDM8-F10 (S106) の構築と同様の2段階のPCR反応により目的の変異が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミド

pCDM8-F10 (S150) を取得した。

pCDM8-F10 (A51) の構築

プライマー1の代わりにプライマー7を、プライマー2の代わりにプライマー8を用いた以外はpCDM8-F10 (S106) の構築と同様の2段階のPCR反応により目的の変位が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaIで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10 (S150) を取得した。

10 pCDM8-F10 (A196) の構築

プライマー1の代わりにプライマー9を、プライマー2の代わりにプライマー10を用いた以外はpCDM8-F10 (S106) の構築と同様の2段階のPCR反応により目的の変位が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaIで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10 (A196) を取得した。

pCDM8-F10 (C84) の構築

プライマー1の代わりにプライマー11を、プライマー2の代わりにプライマー12を用いた以外はpCDM8-F10 (S106) の構築と同様の2段階のPCR反応により目的の変位が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaIで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10 (C84) を取得した。

25 pCDM8-F10 (S150/S106) の構築

pCDM8-F10 (S106) をHindⅢおよびMvaIで消化することによりS106変異を含む約340bpのDNA断片を取得した。またpCDM8-F10 (S150) をMvaIおよびXbaIで消化することによりS15

0 変異を含む約320bpのDNA断片を取得した。これら2種のDNA断片をpCDM8-hF10HXを制限酵素HindⅢおよびXbaIで消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(S150/S106)を取得した。

pCDM8-F10(C84/S106)の構築

pCDM8-F10(C84)をHindⅢおよびScaIで消化することによりC84変異を含む約270bpのDNA断片を取得した。またpCDM8-F10(S106)をScaIおよびXbaIで消化することによりS106変異を含む約390bpのDNA断片を取得した。これら2種のDNA断片をpCDM8-hF10HXを制限酵素HindⅢおよびXbaIで消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(C84/S106)を取得した。

15 pCDM8-F10(A51/A196)の構築

pCDM8-F10(A51)をHindⅢおよびScaIで消化することによりA51変異を含む約270bpのDNA断片を取得した。またpCDM8-F10(A196)をScaIおよびXbaIで消化することによりA196変異を含む約390bpのDNA断片を取得した。これら2種のDNA断片をpCDM8-hF10HXを制限酵素HindⅢおよびXbaIで消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(A51/A196)を取得した。

pCDM8-F10(DN1)の構築(図9B)

25 欠失させる領域をはさむ外側の配列に相補的な配列を有するプライマー13およびプライマー13に相補的なプライマー14を作成した。プラスミドpCDM8-hF10HXを鋳型とし、プライマー13とプライマー3を用いたPCR反応により、DNA断片4を取得した。これとは別に同鋳型に対しプライマー14とプライマー4を用いたPCR反応により、DNA断片5を取得した。次に、こ

のようにして取得されたDNA断片4とDNA断片5を鋳型とし、プライマー3とプライマー4を用いたPCR反応を行なうことにより、目的の欠失が導入されたDNA断片6を取得した。その後、DNA断片6を2種の制限酵素HindⅢとXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したもの5とライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(DN1)を取得した。

pCDM8-F10(DN2)の構築

プライマー13の代わりにプライマー15を、プライマー14の代わりにプライマー16を用いた以外はpCDM8-F10(DN1)の構築と同様の2段階10のPCR反応により目的の欠失が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(DN2)を取得した。15

pCDM8-F10(DN3)の構築

プライマー13の代わりにプライマー17を、プライマー14の代わりにプライマー18を用いた以外はpCDM8-F10(DN1)の構築と同様の2段階20のPCR反応により目的の欠失が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(DN3)を取得した。

pCDM8-F10(DN4)の構築

25 プライマー13の代わりにプライマー19を、プライマー14の代わりにプライマー20を用いた以外はpCDM8-F10(DN1)の構築と同様の2段階のPCR反応により目的の欠失が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を

形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミド pCDM8-F10 (DN4) を取得した。

pCDM8-F10 (DN5) の構築

プライマー13の代わりにプライマー21を、プライマー14の代わりにプライマー22を用いた以外は pCDM8-F10 (DN1) の構築と同様の2段階のPCR反応により目的の欠失が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindIIIおよびXbaIで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能な
5
10 プラスミド pCDM8-F10 (DN5) を取得した。

pCDM8-F10 (DC1) の構築 (図9C)

196位のAsnをコードするコドンが終始コドンに置換された塩基配列を有しかつXbaIを認識配列を有するプライマー23を作成した。プラスミド pCDM8-hF10HXを鋳型とし、プライマー13とプライマー4を用いた
15 PCR反応により、DNA断片7を取得した。次に、このようにして取得されたDNA断片7を2種の制限酵素HindIIIおよびXbaIで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミド pCDM8-F10 (DC1) を取得した。

pCDM8-F10 (DC2) の構築

プライマー23の代わりにプライマー24を用いた以外は pCDM8-F10 (DC1) の構築と同様の1段階のPCR反応により目的の欠失が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindIIIとXbaIで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、
25 大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミド pCDM8-F10 (DC2) を取得した。

pCDM8-F10 (DC3) の構築

プライマー23の代わりにプライマー25を用いた以外は pCDM8-F10 (DC1) の構築と同様の1段階のPCR反応により目的の欠失が導入されたD

NA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢとXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(DC3)を取得した。

5 pCDM8-F10(DC4)の構築

プライマー23の代わりにプライマー26を用いた以外はpCDM8-F10(DC1)の構築と同様の1段階のPCR反応により目的の欠失が導入されたDNA断片を取得後、これを2種の制限酵素HindⅢおよびXbaⅠで切断し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(DC4)を取得した。

pCDM8-F10(SA)の構築(図9D)

変異を含む4本のオリゴヌクレオチド(SA1F, SA1R, SA2F, SA2R)を作製した。これらのオリゴヌクレオチドの5'末端をリン酸化後、SA1FとSA1RあるいはSA2FとSA2Rをそれぞれアニールし、SA1F/SA1R断片およびSA2F/SA2R断片を得た。これら2種の断片をHindⅢおよびBstⅠで消化し、pCDM8-hF10HXを同制限酵素で消化し脱リン酸化したものとライゲートし、大腸菌MC1061/p3株を形質転換することにより、目的のアミノ酸置換を有する蛋白質を発現可能なプラスミドpCDM8-F10(SA)を取得した。

5' → 3'

プライマー1	GAAGGAGAACAGCCCGTACAGCATCCTG
プライマー2	TGCTGTACGGGCTGTTCTCCTTCTTGCT
25 プライマー3	GATCCTCTAGAAGAAACGGT
プライマー4	GTAATACGACTCACTATAGGGC
プライマー5	TAACAATGACAGTAAGCTGAAGGAGAGG
プライマー6	CCTTCAGCTTACTGTCATTGTTAAATTC
プライマー7	AGAGGCCACCGCCTCTTCTTCCTCCTCC

	プライマー 8	AGGAAGAAGAGGCGGTGGCCTCTGGTGA
	プライマー 9	ACGAAGGAAAGCCACCTCTGCTCACTTT
	プライマー 10	GAGCAGAGGTGGCTTTCCTTCGTGTTTT
	プライマー 11	AAAGCTATTCTGTTTCACCAAGTACTTT
5	プライマー 12	ACTTGGTGAAACAGAATAGCTTTCTCCA
	プライマー 13	CTGCCAAGCCAACTCTTCTTCCTCCTCCTT
	プライマー 14	AAGAAGAGTTGGCTTGGCAGGTGACAGGGA
	プライマー 15	CTGCCAAGCCGCGGGAAGGCATGTGCGGAG
	プライマー 16	GCCTTCCCGCGGCTTGGCAGGTGACAGGGA
10	プライマー 17	CTGCCAAGCCCTATTCTCTTTCACCAAGTA
	プライマー 18	AAGAGAATAGGGCTTGGCAGGTGACAGGGA
	プライマー 19	CTGCCAAGCCGAGAACTGCCCCGTACAGCAT
	プライマー 20	GGCAGTTCTCGGCTTGGCAGGTGACAGGGA
	プライマー 21	CTGCCAAGCCGGGAACTCTATGGCTCAA
15	プライマー 22	AGAGTTTCCCGGCTTGGCAGGTGACAGGGA
	プライマー 23	TTTTCTAGACTATTTCTTCGTGTTTT
	プライマー 24	TTTTCTAGACTATCTCCTTGGAGCTCC
	プライマー 25	TTTTCTAGACTACTTCAGCTTACAGTC
	プライマー 26	TTTTCTAGACTACTTCTTGTTTCATGGC
20	S A 1 F	AGCTTCCACCATGTGGAATGGATACTGACACATGCTGCCTCAGCCTTTCCTCA CCTGCCTGGCGCTG
	S A 1 R	CAGGTGAGGAAAGGCTGAGGCAGCATGTGTCAGTATCCATTTCCACATGGTGG
	S A 2 F	CTGCCGCTGCCTTTTTGTTGCTGTTCTTGGTGTCTTCCGTACCTGTCACCTGCC AAGCCC
25	S A 2 R	TTGGCAGGTGACAGGTACGGAAGACACCAAGAACAGCAACAAAAAGGCAGCGGC AGCAGCGCCAGG

FGF10 変体を発現するプラスミドによる COS-1 細胞の形質転換

上記 17 種の FGF10 変体を発現可能なプラスミド DNA を常法に従い大量に調製し、塩化セシウム密度勾配超遠心を 2 回行って精製した。これら 17 種の

プラスミドおよびコントロールとしてpCDM8-hF10HXおよびpCDM8を用いて、電気パルス法によりCOS-1細胞の形質転換を行った。形質転換された細胞を、10%の牛胎児血清を含有するDMEMあるいはIMEM培地で24時間培養後、培地を無血清で10 μ g/mlのヘパリンを含有するIMEM
5 培地に交換し、さらに培養を継続した。培地交換後96時間後に培養液を遠心後、その上清を回収した。このようにして得られた培養上清原液ならびにそれを10 μ g/mlのヘパリンを含有するIMEM培地で10倍希釈した希釈サンプルを分注し、-80℃で凍結保存した。

FRSK細胞を用いた細胞増殖促進活性の検討

10 結果：図10に示すように、FGF10改変体(DN1, DN2, DC2, SA, A51, A196, S150, S106, C84/S106, S150/S106及びA51/A196)を発現可能なプラスミドを用いた得られた培養上清はいずれもpCDM8を用いた得られた培養上清と比較して明らかなトリチュム標識チミジンの取り込みの促進作用を示した。

15 産業上の利用の可能性

以上の結果から明らかなごとく、ヒトFGF-10は、優れた骨/軟骨組織新生ないし再生作用を有し、骨/軟骨組織疾患の治療に有用であることを見出した。このことより、本発明の骨/軟骨疾患治療剤は、たとえば(1)変形性関節症、慢性関節リウマチ等自己免疫疾患に伴う関節炎により生じた軟骨欠損の修復、
20 (2)外傷による軟骨欠損、離断性骨軟骨炎により生じた軟骨欠損の修復、骨を温存する骨きり術時の軟骨形成促進、(5)骨折後の修復、(6)骨欠損後の修復、(7)骨粗鬆症等で局所的に骨減少が認められた部位の骨形成促進等に有用であり、各種骨/軟骨組織疾患治療に用いられる。

本発明は、FGF-10をコードするDNA、当該DNAを担持した発現ベク
25 ター、形質転換体、それらを用いた組換え蛋白の製造方法、および組換え蛋白を提供すると共に、この新規な因子を用いた医薬を提供するものである。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 2 1 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : ラット

配列

Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu

1 5 10 15

Pro Gly Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser Val

20 25 30

Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu Ala

35 40 45

Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe

50 55 60

Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu

65 70 75 80

Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe

85 90 95

Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn

100 105 110

Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val

115 120 125

Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys

130 135 140

Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys

3 2

145 150 155 160
 Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp
 165 170 175
 Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala
 180 185 190
 Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe
 195 200 205
 Leu Pro Met Val Val His Ser
 210 215

配列番号 : 2

配列の長さ : 208

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : ヒト

配列

Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Cys Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser
 20 25 30
 Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu
 35 40 45
 Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly
 50 55 60
 Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg
 65 70 75 80
 Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly

3 3

85	90	95
Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu		
100	105	110
Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser		
115	120	125
Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys		
130	135	140
Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly		
145	150	155
Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met		
165	170	175
Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr		
180	185	190
Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser		
195	200	205

配列番号 : 3

配列の長さ : 8 0 4 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

起源

生物名 : ラット

存在位置 : 1 0 9 - 7 5 3

特徴を決定した方法 : E

配列

TAACCACTAG CCATCACCTC CAGCTGTCTC TTTGCCTCGC ACCAGGTCTT ACCCTTCCAG	60
TATGTTTCCTT CTGATGAGAC AATTTCCAGT GCCGAGAGTT TCAGTACA ATG TGG AAG	117

TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCG GGC TGC 165
 TGT TGC TGC TTC TTG TTG CTC TTC TTG GTG TCT TCC GTC CCT GTC ACC 213
 TGC CAA GCT CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCG GAG GCT ACC AAC TCC 261
 TCT TCC TCC TCC TCT TCC TCC TCC TCG TCC TCT TCC TTC TCC TCT CCT 309
 TCC AGC GCG GGG AGG CAT GTG CCG AGC TAC AAT CAC CTC CAG GGA GAT 357
 GTC CGC TGG AGA AAG CTG TTC TCC TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT 405
 GAA AAG AAC GGC AAG GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAA AAC TGT CCG TAC 453
 AGT ATC CTA GAG ATA ACA TCA GTG GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA 501
 GCC ATT AAC AGC AAC TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC 549
 TAT GGC TCA AAA GAA TTT AAC AAT GAC TGT AAA CTG AAA GAG AGG ATA 597
 GAG GAA AAT GGA TAC AAC ACC TAT GCA TCT TTT AAC TGG CAG CAC AAC 645
 GGC AGG CAA ATG TAT GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCC AGG AGA 693
 GGA CAA AAA ACA AGA AGG AAA AAC ACC TCC GCT CAC TTC CTC CCC ATG 741
 GTG GTC CAC TCA TAGAAGA AGGCACCGTT GGTGGATGCA GTACAACCAA TGACTCTTTG 800
 CCAA

配列番号 : 4

配列の長さ : 6 9 0 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

起源

生物名 : ヒト

配列

CTTCCAGTAT GTTCCTTCTG ATGAGACAAT TTCCAGTGCC GAGAGTTCCA GTACA ATG 58
 TGG AAA TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCC 106
 GGC TGC TGC TGC TGC TGC TTT TTG TTG CTG TTC TTG GTG TCT TCC GTC 154
 CCT GTC ACC TGC CAA GCC CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCA GAG GCC 202

ACC AAC TCT TCT TCC TCC TCC TTC TCC TCT CCT TCC AGC GCG GGA AGG 250
CAT GTG CCG AGC TAC AAT CAC CTT CAA GGA GAT GTC CGC TGG AGA AAG 298
CTA TTC TCT TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT GAG AAG AAC GGG AAG 346
GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAG AAC TGC CCG TAC AGC ATC CTG GAG ATA 394
ACA TCA GTA GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA GCC ATT AAC AGC AAC 442
TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC TAT GGC TCA AAA GAA 490
TTT AAC AAT GAC TGT AAG CTG AAG GAG AGG ATA GAG GAA AAT GGA TAC 538
AAT ACC TAT GCA TCA TTT AAC TGG CAG CAT AAT GGG AGG CAA ATG TAT 586
GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCA AGG AGA GGA CAG AAA ACA CGA 634
AGG AAA AAC ACC TCT GCT CAC TTT CTT CCA ATG GTG GTA CAC TCA TAGAG 684
GAAGGC 690

配列番号 : 5

配列の長さ : 2 2 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

GATGCATAGG TATTGTATCC AT

配列番号 : 6

配列の長さ : 2 1 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

TCCATTTTCC TCTATCCTCT C

配列番号 : 7

配列の長さ : 2 0 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

AGAAGGGGAA ACTCTATGGC

配列番号 : 8

配列の長さ : 2 1 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

GACTGTAAAC TGAAAGAGAG G

配列番号 : 9

配列の長さ : 3 2 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

GCGAGCTCAA GCTTTTTTTT TTTTTTTTTT TT

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 1 8 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

CCGAGCTCAA GCTTTTTT

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 2 0 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

CTTCCAGTAT CATCCTTCTG

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 2 0 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

GGCAAAGAGT CATTGGTTGT

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 2 2 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列 :

GATGCATAGG TATTGTATCC AT

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 2 2 b p

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GAAACTCTAT GGCTCAAAG AA

配列番号：1 5

配列の長さ：2 0 b p

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GTACACTCAT AGAGGAAGGC

配列番号：1 6

配列の長さ：3 4 b p

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GGGAATTCCA TATGCTTGGT CAGGACATGG TGTC

配列番号：1 7

配列の長さ：2 9 b p

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

CGCGGATCCG CTATGCATGC AACGCGTTG

請求の範囲

1. 配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列のポリペプチドである線維芽細胞増殖因子をコードする塩基配列、またはこれに相補的な塩基配列
- 5 5 を包含する組換えDNA。
2. 配列番号：3もしくは配列番号：4に示す塩基配列またはこれに相補的な塩基配列を包含する請求の範囲1のDNA。
3. 請求の範囲1のDNAを担持する発現ベクター。
4. 請求の範囲3の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。
- 10 5. 宿主が動物細胞または大腸菌である請求の範囲4の形質転換体。
6. 請求の範囲4の形質転換体を使用することを特徴とする組換え線維芽細胞増殖因子の製造方法。
7. 配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。
- 15 8. 請求の範囲5の形質転換体が生産し、細胞増殖活性を示す事を特徴とする、配列番号：1もしくは配列番号：2に示すアミノ酸配列またはその主要部分を包含するポリペプチドである組換え線維芽細胞増殖因子。
9. 請求の範囲7もしくは8の組換え線維芽細胞増殖因子を有効成分として含有する医薬。
- 20 10. 骨／軟骨疾患または骨／軟骨損傷治療剤である請求の範囲9の医薬。
11. 創傷治癒促進剤である請求の範囲9の医薬。
12. 骨／軟骨疾患または骨／軟骨損傷治療剤の製造のための請求の範囲7もしくは8の組換え線維芽細胞増殖因子の使用。
13. 創傷治癒促進剤の製造のための請求の範囲7もしくは8の組換え線維芽細胞増殖因子の使用。
- 25 14. 請求の範囲7もしくは8の組換え線維芽細胞増殖因子の有効量をヒトを含む動物に投与することを含む骨／軟骨疾患または骨／軟骨損傷の治療方法。
15. 請求の範囲7もしくは8の組換え線維芽細胞増殖因子の有効量をヒトを含む動物に投与することを含む創傷治癒促進方法。

1/8

FIG.1

センスプライマー

Tyr Leu Ala Met Asn Lys

5' - TAC CTA GCA ATG AAC AA -3'

T C C T

G G

T T

アンチセンスプライマー

Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser

3' - ATA TTA TGA ATA CGA AG -5'

G G C G C

G G

T T

FIG.2

5'RACE法;

A: 5'-CCT CTC TTT CAG TTT ACA GTC -3'

A': 5'-GAT GCA TAG GTA TTG TAT CCA T-3'

B: 5'-TCC ATT TTC CTC TAT CCT CTC -3'

X: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

Y: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT -3'

3'RACE法;

C: 5'-AGA AGG GGA AAC TCT ATG GC -3'

D: 5'-GAC TGT AAA CTG AAA GAG AGG -3'

D': 5'-GAA ACT CTA TGG CTC AAA AGA A-3'

X: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

Y: 5'-GCG AGC TCA AGC TTT TTT -3'

全配列

E: 5'-CTT CCA GTA TGT TCC TTC TG-3'

増幅用

F: 5'-GGC AAA GAG TCA TTG GTT GT-3'

F': 5'-GTA CAC TCA TAG AGG AAG GC-3'

2/8

FIG.3

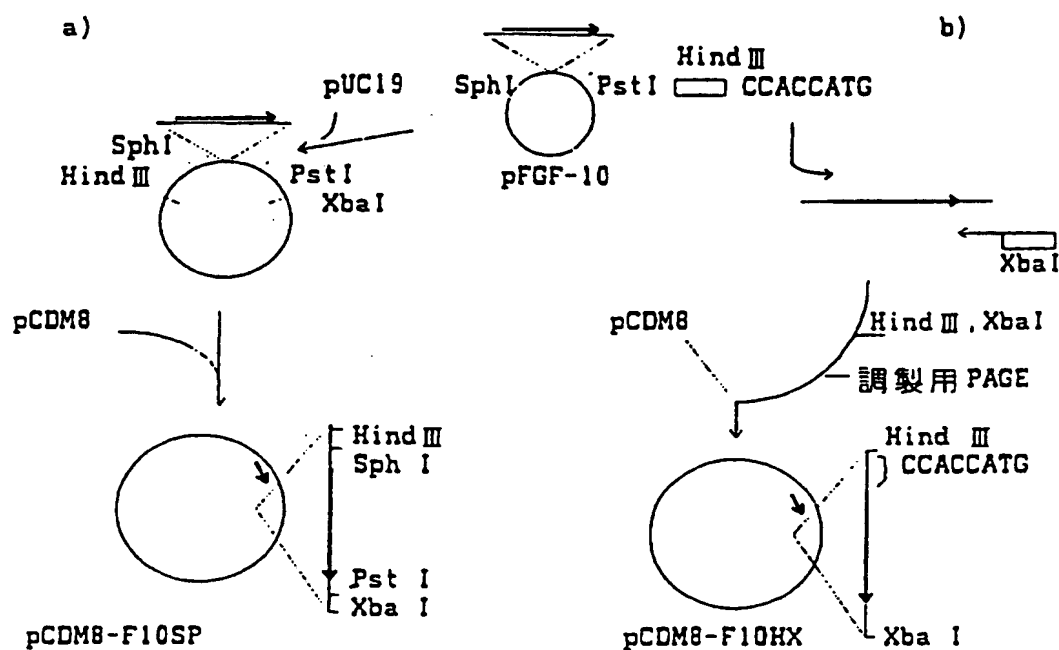


FIG.4

推定翻訳開始コドン上流をコザックのコンセンサス配列に置換するために用いたプライマーの塩基配列

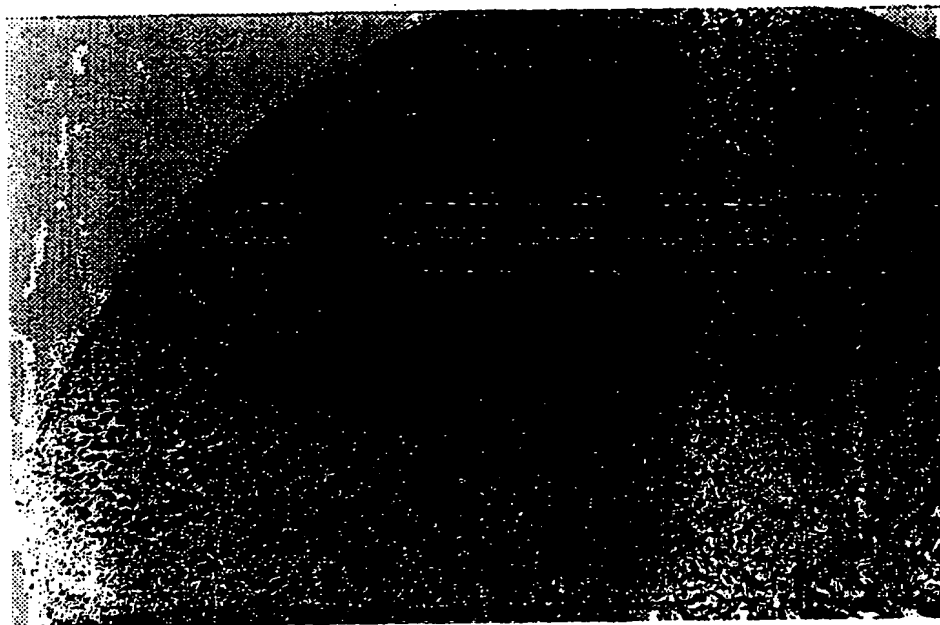
名称	塩基数	配列(5'→3')
F10HS	35mer	TTTTAAGCTT CCACC ATGTGGAAGTGGATACTGAC
F10XR	27mer	AAAATCTAGA GTCATTGGTTGTACTGC

反応条件:	pFGF-10 (0.5 μ g/ μ l)	2 μ l
	10xPCR buffer	10
	10 μ M F10HS	2.5
	10 μ M F10XR	2.5
	dNTP mix (TaKaRa)	8
	dH ₂ O	74.5
	AmpliTaq	0.5 /100 μ l

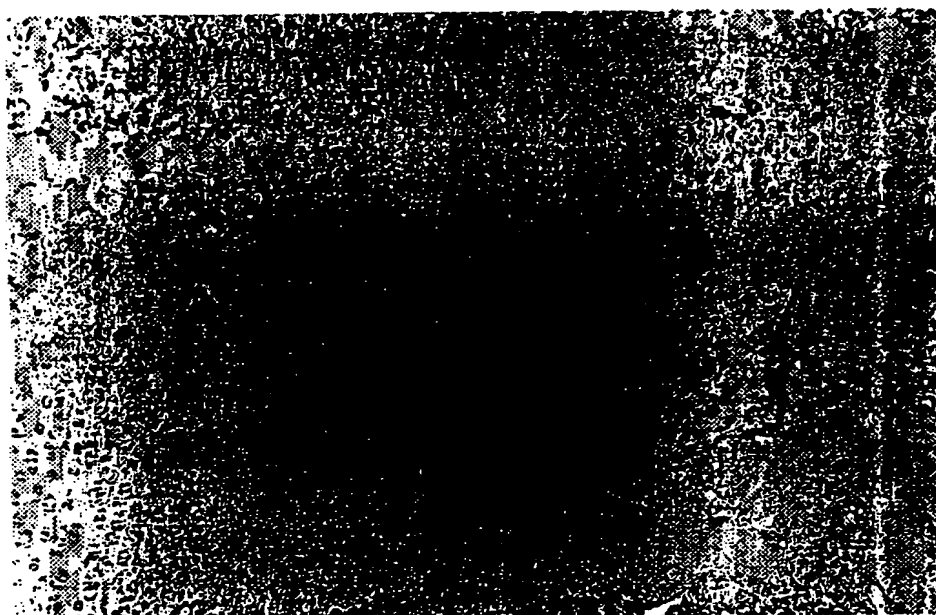
94℃	30 秒] x 10回
94℃	60 秒	
56℃	60 秒	
72℃	60 秒	
72℃	9 分	

変異導入切片

FIG.5

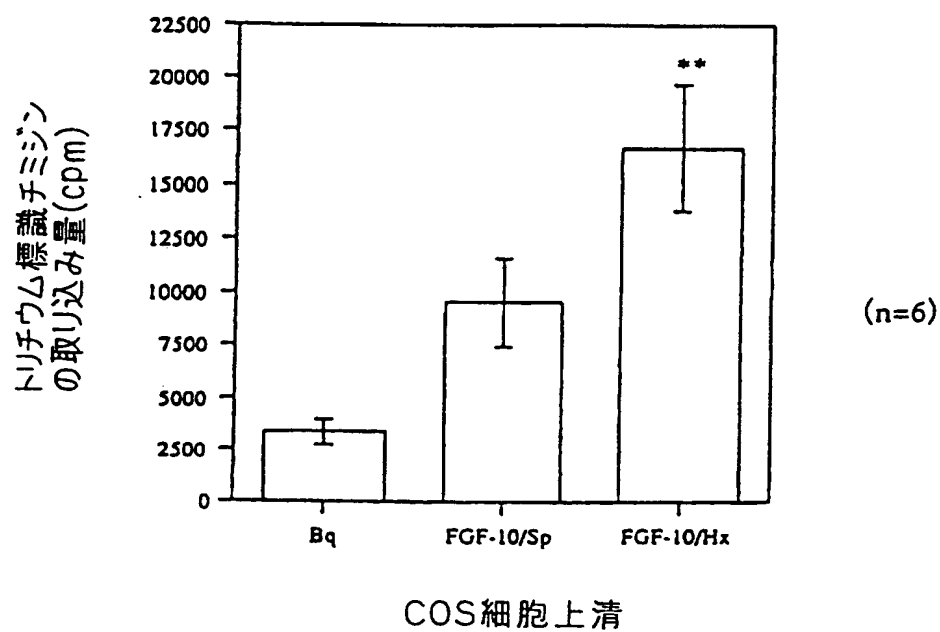


(A) 関節軟骨の薄切り組織標本の顕微鏡写真



(B) 骨端軟骨板の薄切り組織標本の顕微鏡写真

FIG.6



COS細胞上清添加後のFRSK細胞によるトリチウム標識チミジンの取り込み量の変化。

値は平均±標準誤差で、有意差はBqに対して**； $P < 0.01$ で示した。

FIG. 7



試験例におけるヒトFGF-10投与群の脛骨軟X線写真画像処理像
(上:FGF-10 10.6 μ g, 下 FGF-10 21.2 μ g)

6 / 8

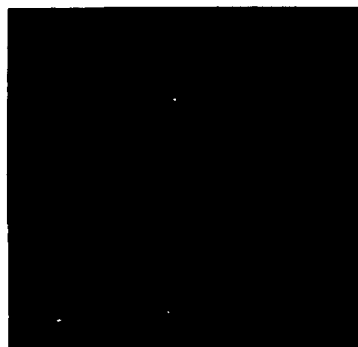
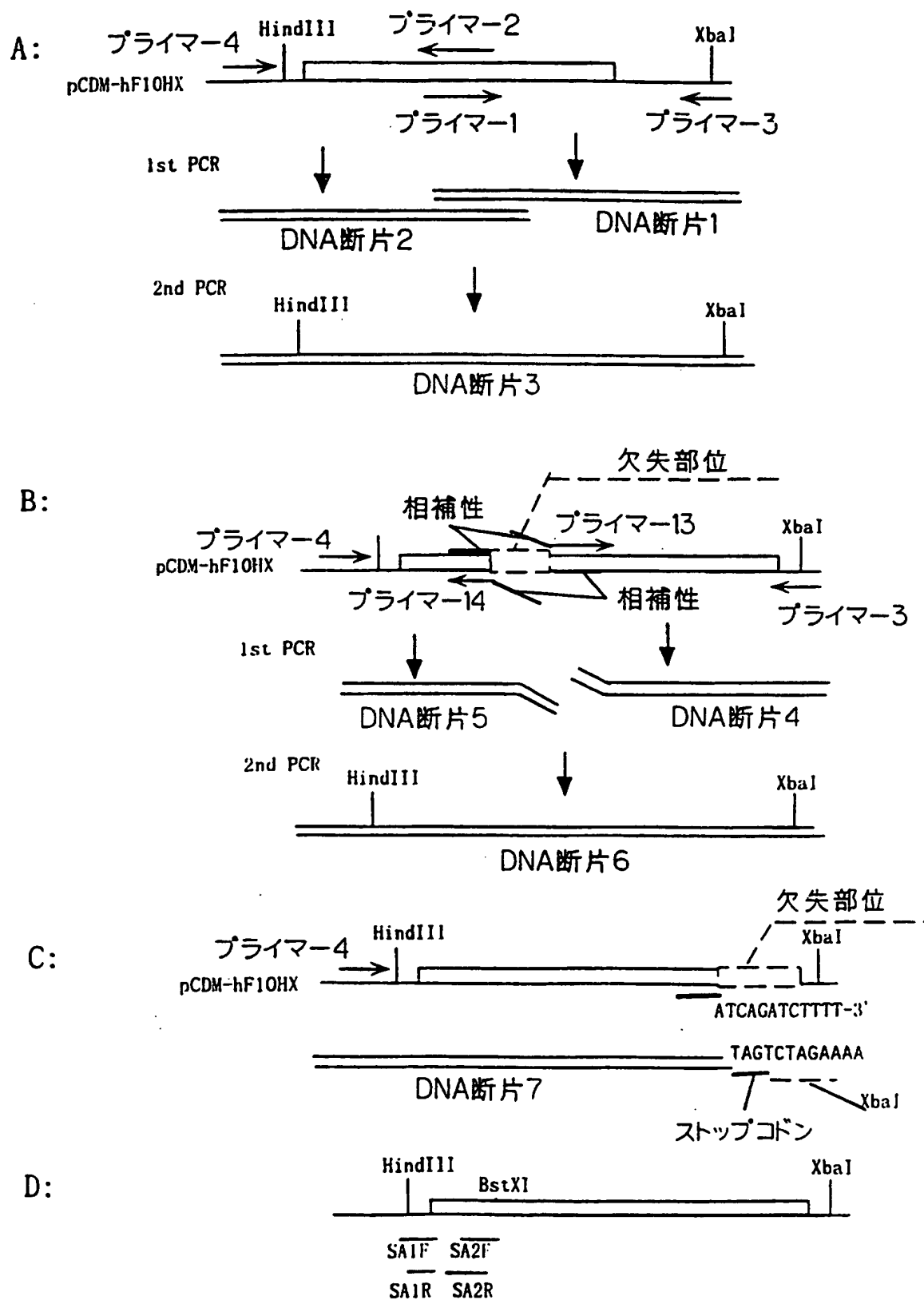


FIG. 8

試験例における対照群の脛骨軟X線写真画像処理像

7/8

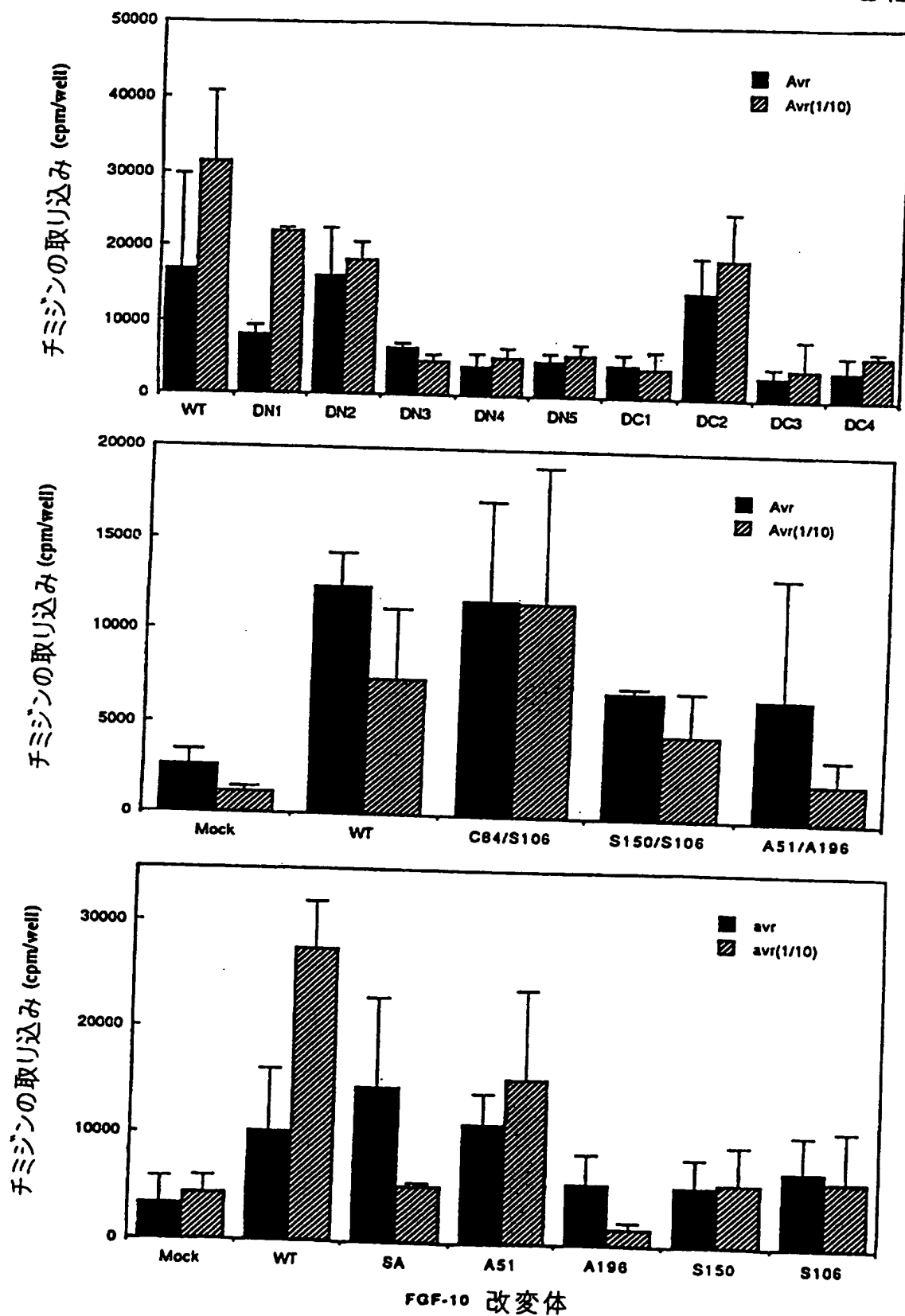
FIG.9



8 / 8

FIG.10

FRSK細胞に対するFGF-10改変体のマイトジェン活性



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/50, A61K37/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/50, A61K37/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS, WPI, Biosis previews

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, A1, 96/25422 (Human Genome Sciences, Inc.), August 22, 1996 (22. 08. 96)	1 - 15
P, X	J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 27, (1996. July), Yamasaki et al., "Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family" P. 15918-15921	1 - 15
A	Cell, Vol. 27, No. 9, (1995), P. 341-344	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
February 18, 1997 (18. 02. 97)

Date of mailing of the international search report
February 25, 1997 (25. 02. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/50, A61K37/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/50, A61K37/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS, WPI, Biosis previews

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, A1, 96/25422 (Humman Genome Sciences, Inc.) 22.8月.1996 (22.08.96)	1-15
P, X	J. Biol. Chem., 第271巻, 第27号, (1996.7月), Yamasaki et al., 「Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family」 P.15918-15921	1-15
A	細胞, 第27巻, 第9号, (1995), P.341-344	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
18.02.97

国際調査報告の発送日

25.02.97

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
新見 浩一

印

4B 9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448